



Analyses spectroscopiques du liquide céphalo-rachidien de rat en ex vivo et du noyau du raphé dorsal in vivo

S. Mottin, C. Tran-Minh, P. Laporte, R. Cespuglio, M. Jouvet

► To cite this version:

S. Mottin, C. Tran-Minh, P. Laporte, R. Cespuglio, M. Jouvet. Analyses spectroscopiques du liquide céphalo-rachidien de rat en ex vivo et du noyau du raphé dorsal in vivo. Journal de Physique IV Proceedings, 1994, 04 (C4), pp.C4-261-C4-264. 10.1051/jp4:1994460 . jpa-00252723

HAL Id: jpa-00252723

<https://hal.science/jpa-00252723>

Submitted on 1 Jan 1994

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Analyses spectroscopiques du liquide céphalo-rachidien de rat en *ex vivo* et du noyau du raphe dorsal *in vivo*

S. MOTTIN, C. TRAN-MINH, P. LAPORTE*, R. CESPUGLIO** et M. JOUVET**

Laboratoire de Biotechnologie, Ecole Nationale Supérieure des Mines, 42023 Saint-Etienne, France

* Laboratoire T.S.I., URA 842 du CNRS, Univ. J. Monnet, 42023 Saint-Etienne, France

** Département de Médecine Expérimentale, INSERM U 52, Univ. Cl. Bernard, 69373 Lyon, France

RÉSUMÉ

Les propriétés d'absorption et de fluorescence du liquide céphalo-rachidien (LCR) ponctionné au niveau de la *cisterna magna* du rat, sont analysées puis comparées à l'émission mesurée *in situ* dans le noyau du raphe dorsal du rat libre de tous mouvements. Les mesures de fluorescence en *ex vivo* du LCR et *in vivo* du noyau raphe dorsal, ont été réalisées par la mise en œuvre d'un microcapteur à fibre optique (FOCS). La fluorescence mesurée *in vivo* sous excitation à 337 nm, présente 2 pics d'émission situés vers 410 et 460 nm. Les spectres d'absorption, d'émission en fluorescence statique et en fluorescence induite par laser sont rapportés. Avec des domaines de longueur d'onde d'excitation de 300-315 nm, 320-355 nm et 360-470 nm, les spectres d'émission du LCR en *ex vivo* montrent respectivement des pics centrés vers 340 nm, 390 nm et 530 nm. Malgré les limites liées aux différences de localisation anatomique, ces approches ainsi que celles de la littérature permettent de suggérer que le signal de fluorescence mesuré *in vivo* à 460nm pourrait dépendre pour une grande partie du NADH intracellulaire.

ABSTRACT

The fluorescence properties of cerebrospinal fluid (CSF) drawn from the rat *cisterna magna*, are investigated and compared to the *in vivo* emission derived from the nucleus raphe dorsalis of the freely moving rat. Measurement in the CSF in *ex vivo* conditions or *in situ* in the nucleus raphe dorsalis, were realized by way of a fiber optic chemical sensor (FOCS). The *in vivo* emission, obtained with an excitation wavelength at 337 nm, exhibits 2 peaks around 410 and 460 nm. Absorption spectra, steady-state emission spectra and laser induced time-resolved fluorescence of CSF are reported. With excitation wavelength in the ranges 300-315 nm, 320-355 nm and 360-470 nm, the steady-state emission spectra of CSF exhibit peaks respectively around 340 nm, 390 nm and 530 nm. Despite the limitation attached to the anatomical position, the above data together with those of the literature suggest that *in vivo* fluorescent signal may be essentially dependent upon intracellular NADH.

I. INTRODUCTION

La première étude de fluorométrie réalisée *in situ* au niveau de la surface cérébrale, a été publiée dès 1962 par Chance, B. et coll. [1]. Plus récemment, différents montages de fibres optiques millimétriques et submillimétriques ont été utilisés chez le rat anesthésié ou libre de tous mouvements pour suivre la fluorescence cérébrale du NADH [2], [3]. La nouvelle génération de FOCS implanté a pour objet la mesure des variations relatives de certains fluorophores comme le NADH en fonction des états de vigilance (éveil, sommeil à ondes lentes et sommeil

paradoxal) [3]. Une des questions primordiales concernant les signaux de fluorescence dérivés du tissu cérébral, sous illumination à 337 nm, reste le compartiment où se réalise la mesure. En effet, la pénétration du flux du laser sur des tranches cérébrales est de l'ordre de quelques centaines de microns et inférieure à 500 μm [1]. Le volume analysé est donc considérablement complexe vu l'hétérogénéité du tissu cérébral. Afin d'aborder ce milieu, nous avons choisi d'explorer quelques propriétés photophysiques d'un modèle simple: le liquide céphalo-rachidien fraîchement prélevé au niveau de la *cisterna magna*.

II. ÉCHANTILLON ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Le prélèvement de LCR a été réalisé sous anesthésie au pentobarbital (5 mg/kg). Le LCR prélevé au niveau de la *cisterna magna* se présente sous la forme de liquide incolore légèrement opalescent. Tout échantillon présentant des traces de sang a été écarté. Chaque échantillon analysé, de l'ordre de 200 μl , provient du prélèvement de deux rats males OFA/CREDO.

Les mesures d'absorption ont été réalisées sur un modèle 860 Uvikon de la société Kontron. La fluorescence statique a été mesurée sur un modèle F4500 de la société Hitachi.

La technique instrumentale et le capteur utilisés pour les mesures *in vivo* ont été décrits précédemment [3], [4]. Nous présentons le montage succinctement (Figure 1). Le capteur monofibre et monobrin de 200 μm de diamètre, met en œuvre des longueurs de quelques mètres.

Le monochromateur est utilisé avec une résolution de 4 nm.

Le laser fonctionne à 20 Hz. L'impulsion du laser azote (longueur d'onde de 337nm) est de 300 ps à mi-hauteur. L'impulsion de fluorescence est intégrée sur une fenêtre temporelle de 10ns.

Les aires intégrées sont moyennées sur 256 coups lasers.

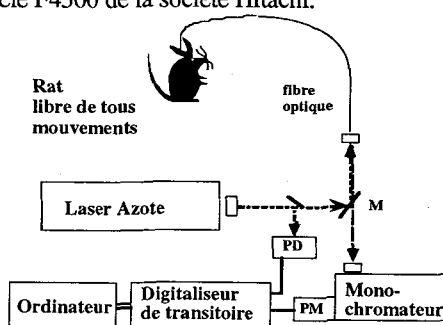


Figure 1: Représentation du montage expérimental utilisé *in vivo*. PD: photodiode; PM: photomultiplicateur; M: miroir dichroïque.

III. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET DISCUSSION

La Figure 2 présente quatre spectres non corrigés d'émissions typiques de fluorescence obtenus en fonction du temps *in vivo* au niveau du noyau du raphe dorsal. Le spectre d'émission lié au bruit intrinsèque du capteur à fibre optique est indiqué. Sur les spectres *in vivo* il apparaît clairement deux pics d'émission centré vers 400 nm et 460 nm. Le pic mesuré à 460 nm est attribué majoritairement au NADH présent dans le volume exploré [1].

Le spectre d'émission d'une solution de NADH est mesuré dans les mêmes conditions juste après ces mesures *in vivo*. Cette mesure *in vitro* permet la comparaison avec les signaux d'émission mesurés *in vivo*.

Afin de tenter d'élucider de quel compartiment provient la mesure des 2 pics d'émission observés *in vivo*, nous avons entrepris 3 types de mesures :

- absorption du LCR dans la gamme 240-340 nm;
- fluorescence statique du LCR pour des longueurs d'onde d'émission de 300 à 600nm et d'excitation de 300 à 400 nm;

• fluorescence du LCR induite par laser et mesurée dans des conditions comparables à celles *in vivo*.

Sur la Figure 3, le spectre d'absorption moyen du LCR dilué et non dilué ($n=5$), présente un pic centré vers 266 nm. Sur du LCR non dilué, la transmission de la lumière à 266 nm est de seulement 10% au bout de 33 μm . Il faut souligner l'absence de pic d'absorption mesurable à 340 nm. La densité optique mesurée à 337 nm est d'environ 0.02, soit 95% de transmission au bout de 200 μm .

Avec des domaines de longueur d'onde d'excitation de 300-315 nm, 320-355 nm et 360-470 nm, les spectres d'émission du LCR en *ex vivo* montrent respectivement des pics centrés vers 340 nm, 390 nm et 530 nm (Figure 4). L'émission vers 340 nm est largement plus importante que les deux autres. Pour des longueurs d'onde d'excitation inférieures à 315 nm, seule l'émission centrée à 340 nm a pu être observée avec un maximum d'émission pour des excitations à 230 et 295 nm. La même émission est retrouvée dans le sérum humain [5]. L'émission à 340 nm peut être raisonnablement attribuée au tryptophane bien que celle-ci s'étende un peu plus vers le rouge. En outre, certains auteurs ont rapporté que d'autres composés que le tryptophane présentaient des données spectrales assez semblables dans la région 295/405 nm (longueur d'onde d'excitation/longueur d'onde d'émission) dans le sérum [6].

Pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 315 nm, de faibles émissions ont été identifiées: l'une est centrée vers 390 nm, l'autre vers 530 nm. L'attribution moléculaire de l'émission à 390 nm n'est pas aisée. Certains auteurs ont détecté la présence de nombreux composés endogènes fluorescents dans l'ultrafiltrat de sérum humain par HPLC, avec une détection à 415 nm et une excitation à 322 nm [7]. Concernant les dérivés du tryptophane, Wolfbeis et coll. ont présenté certaines identifications moléculaires [5], [8] : l'indoxyl sulfate (indican) 290/385 nm, l'acide 3-Hydroxy-anthranilique 320/415 nm, et les composés de la famille de la vitamine B₆ (pyridoxine) 290-320/390 nm. Ces résultats sont retrouvés pour le sérum humain [5]. Wolfbeis et coll. attribuent les pics à 450/530 nm à la bilirubine liée à l'albumine. Les pics vers 370/530 nm sont, eux, partiellement identifiés et proviendraient des flavines (riboflavine, vitamine B₂...) [5]. Contrairement aux résultats obtenus avec le sérum [5], aucune émission attribuable au NADH n'a été détectée à 460 nm.

Nous avons reporté sur la Figure 5 les spectres d'émission du LCR mesurés avec le FOCS (longueur d'onde d'excitation égale à 337 nm). En accord avec les résultats obtenus en absorption et en fluorescence statique, seule une très faible fluorescence (vers 450-460 nm) a pu être mesurée dans ces conditions.

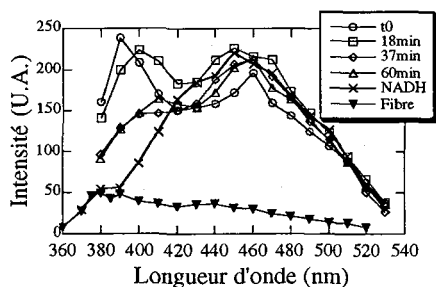


Figure 2: Spectres d'émission des noyaux du raphé dorsal obtenus *in vivo* (symboles ouverts), d'une solution de NADH (pH7, concentration égale à 15 μM) et de la fibre plongeant dans de l'eau. Le temps indiqué correspond au premier point du spectre (380 nm).

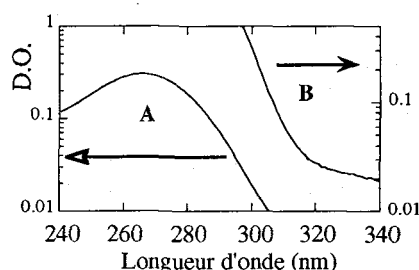


Figure 3: Spectre d'absorption du LCR (trajet d'absorption égal à 200 μm). Les courbes A et B correspondent respectivement aux spectres du LCR dilué à 1/20 et sans dilution.

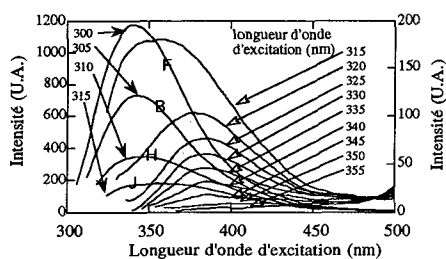


Figure 4: Spectres d'émission du LCR à différentes longueurs d'ondes d'excitation obtenus en fluorescence statique. Les courbes avec des symboles ont leurs ordonnées à gauche.

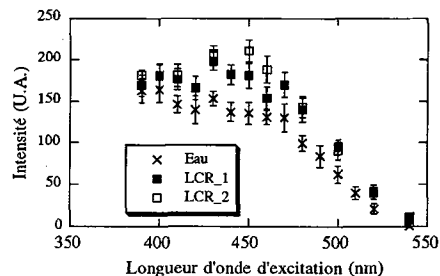


Figure 5: Spectres d'émission du LCR mesurés par le capteur à fibre optique sous excitation laser à 337 nm. Chacune des courbes LCR_1 et LCR_2 proviennent d'un échantillon issu d'un prélèvement sur 2 rats. Les barres correspondent à la déviation standard de 5 mesures successives.

IV. CONCLUSION

A la vue de ces résultats, il pourrait être suggéré que les mesures réalisées dans le tissu soient peu affectées par le LCR où elles baignent. Il faut toutefois marquer une réserve car les LCR respectivement des cavités et du tissu peuvent être différents. Ce dernier peut refléter des événements locaux variables et parfois opposés selon la zone cérébrale considérée; le LCR ventriculaire ne reflète que l'intégrale de ces variations spécifiques. Pour prendre en compte ces réserves, le terme de fluorophores "endogènes" englobant les compartiments intracellulaire et extracellulaire est le plus approprié. Ainsi l'émission de fluorescence mesurée *in vivo* à 460 nm par le FOCS au niveau du noyau raphé dorsal et liée au NADH endogène, pourrait provenir du compartiment intracellulaire essentiellement. L'étude des variations du NADH endogène et des fluorophores responsables de l'émission à 400 nm en fonction des états de vigilance est en cours.

RÉFÉRENCES

- [1] B. Chance, P. Cohen, F. Jobsis et B. Schoener, *Science*, **1962**, 137, pp. 499-508.
- [2] A. Mayevsky and B. Chance, *Science*, **1982**, 217, pp. 537-540.
- [3] S. Mottin, C. Tran-Minh, P. Laporte, R. Cespuglio et M. Jouvét, IEEE Engineering in medicine and biology society proc. 14th Annual Int. Conf. **1992**, pp. 235-238.
- [4] S. Mottin, C. Tran-Minh, P. Laporte, R. Cespuglio et M. Jouvét, *Applied Spectroscopy*, **1993**, 47, pp. 590-597.
- [5] O. S. Wolfbeis et M. Leiner, *Anal.Chim.Acta*; **1985**, 167, pp. 203-215.
- [6] J. S. Swan, E. Y. Kragten et H. Veening, *Clin.Chem*; **1983**, 29, 6, pp. 1082-1084.
- [7] H. Mabuchi, H. Nakahashi, *Clin.Chem*; **1983**, 29, 4, pp. 675-677.
- [8] O. S. Wolfbeis, S. G. Schulman, *The fluorescence of organic natural products; Molecular Luminescence Spectroscopy, method and applications: Part 1*; New-York; Wiley J. & sons; **1985**, 77, pp. 167-370.